

# Effective methods for In Vitro immunization and electrofusion for establishment of functional monoclonal antibodies

著者	加藤 三恵子
内容記述	Thesis (Ph. D. in Science)--University of Tsukuba, (A), no. 6345, 2012.11.30 Includes bibliographical references (leaves 66-79)
発行年	2012
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/120355">http://hdl.handle.net/2241/120355</a>

氏 名 (本籍)	加 <sup>か</sup> 藤 <sup>とう</sup> 三 <sup>み</sup> 恵 <sup>え</sup> 子 (東 京 都)			
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)			
学 位 記 番 号	博 甲 第 6345 号			
学位授与年月日	平成 24 年 11 月 30 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科			
学 位 論 文 題 目	<b>Effective Methods for <i>In Vitro</i> Immunization and Electrofusion for Establishment of Functional Monoclonal Antibodies</b> (機能性抗体取得のための効率的な試験管内免疫法および電気的細胞融合法の確立)			
主	査	筑波大学教授	博士 (医学)	千 葉 智 樹
副	査	筑波大学教授	理学博士	漆 原 秀 子
副	査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治
副	査	筑波大学准教授	理学博士	坂 本 和 一

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

抗体は、様々な異物から生体を防御し恒常性を保つ役割を果たしている。モノクローナル抗体は単一の抗原エピトープを認識することから、抗体医薬や臨床検査薬、そして生命科学研究の分野において重用されており、その重要性は益々高まっている。モノクローナル抗体の作製は (1) 動物の免疫、(2) ハイブリドーマの樹立、(3) スクリーニングの 3 工程からなり、その作製技術は確立しているものの、第一工程である動物の免疫には、動物個体に有毒な抗原を使用できないことや、十分な免疫反応を誘導するために大量の抗原と長期間の免疫期間が必要とされるなどの制約がある。また第二の工程であるハイブリドーマの樹立は、その効率が低いがために、第三工程であるスクリーニングでは多くの労力が必要となっているなど様々な課題が残されている。ポストゲノム時代の生命科学研究にモノクローナル抗体は必須であり、モノクローナル抗体を効率的かつ迅速に作製する技術の開発が求められている。そこで本研究では、モノクローナル抗体を効率的に取得可能な試験管内免疫法および電気的細胞融合法を開発し、その実証試験を行なった。

まず第 1 章では、脾細胞や末梢血単核球を試験管内で免疫する *in vitro* 免疫法を開発した。本法は、免疫期間が短く、抗原が少量で済むことや、自己抗原や毒性抗原に対する抗体の作製が可能である等の利点がある。しかし、得られる抗体産生細胞数が少なく、また誘導される抗体のサブタイプも親和性が低い IgM であることが問題となっている。そこで、免疫細胞の抗体産生、遺伝子発現、サイトカイン産生を指標に、効率的に IgG 抗体産生を誘導する培養法を検討した。その結果、1 次抗原刺激、細胞増殖刺激、2 次抗原刺激の 3 ステップからなる培養法を開発することに成功した。この過程における遺伝子発現を解析した結果、形質細胞分化時に発現する転写因子 Blimp-1 や、抗体の親和性成熟に必要な高頻度突然変異の誘導因子 AID 等、B 細胞の細胞分化に関わる遺伝子の発現が亢進していた。また CD4 陽性ヘルパー T 細胞の産生するサイトカインを調べた結果、Th2 型の IL-4・IL-5 と Th1 型の IFN- $\gamma$ ・GM-CSF が増加していた。効率的な抗体産生には CD4 陽性ヘルパー T 細胞が Th2 型優勢となることが重要であり、本法では培養時の脾細胞濃度を調節することで Th1/2 型を制御できることも判明した。以上、本研究により抗原特異的 IgG 抗体を効率的に産生

する試験管内免疫法が確立された。

第2章では、抗体産生細胞とミエローマ細胞を融合するハイブリドーマの樹立法を確立した。従来法のポリエチレングリコール（PEG）は広く行なわれているが、その融合効率は約  $1 \times 10^{-5}$  と極めて低い。一方、融合効率が高いと期待される電氣的細胞融合法は、抗体産生細胞に対しては有効なプロトコルが確立していない。それは抗体産生細胞とミエローマ細胞では細胞の穿孔に至適な電流が異なるためである。この問題を解決する目的で様々な方法が試みられているが、本研究では抗体産生細胞を賦活化する種々の刺激剤を検討した。その結果、CpG モチーフを含むオリゴヌクレオチド（CpG ODN）は他の免疫賦活物質に比べて高い効果を示し、その効率は PEG 法の 100 倍以上であった。CpG ODN 刺激した脾細胞は膨張した特徴的な形態を示し、その平均細胞直径は  $9.2 \mu\text{m}$  であった。それに対して CpG ODN 以外の免疫刺激物質ではその平均細胞直径は  $7 \sim 8 \mu\text{m}$  であり、膨張した特徴的な細胞は認められなかった。至適電流が異なる理由の一つとして細胞直径の差が原因であると考えられており、細胞の肥大化は、直径約  $10 \mu\text{m}$  のミエローマ細胞との電氣的融合に有利に働いたと考えられた。また、膨張した細胞をフローサイトメータで解析した結果、刺激によって CD45R 陽性 B 細胞と CD138 陽性形質細胞が膨張していた。CpG ODN は、自然免疫に重要な Toll 様受容体 TLR9 を介して細胞を活性化すること、TLR9 は形質細胞に最終分化した細胞で発現することから、CpG ODN は抗体を産生する形質細胞を選択的に刺激したと考えられた。

最後に第3章では、上記開発したハイブリドーマ産生技術を用いて機能性抗体を効率的にスクリーニングできるか、*Gaussia princeps*（海洋性カイアシ類）由来ルシフェラーゼを抗原として実証試験を行なった。ハイブリドーマの樹立効率は一般に  $\sim 10^{-5}$  であることからスクリーニングは親和性と機能性の2回に分けて行なわれるが、本法では効率が 100 倍となることから、機能性スクリーニングのみで抗体取得が可能であるか検討した。脾細胞  $2 \times 10^5$  から PEG 法と電氣的細胞融合法を用いてハイブリドーマを作製した結果、PEG 法では 1 株、電氣的細胞融合法では 250 株のハイブリドーマが樹立された。その培養上清とルシフェラーゼを混合し、発光活性を測定したところ、電氣的細胞融合法のみにルシフェラーゼの発光機能を阻害するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ 2 株が認められた。これらの抗体は、抗原との抗原親和性が高いにも関わらず、エピトープ・マッピングでは抗原のアミノ酸配列に反応しなかったため、抗原の一次構造ではなく高次構造を認識する抗体であると考えられた。以上、効率的な試験管内免疫法および電氣的細胞融合法を確立し、1 回の機能性スクリーニングのみで機能性抗体を取得できることを実証した。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、生命科学研究の諸分野における要請が大きいモノクローナル抗体の作製技術に革新をもたらすものであり、その成果は高く評価される。特に試験管内免疫法では困難であった IgG 抗体産生を誘導したこと、そしてハイブリドーマの樹立効率を 100 倍以上に高めたことは特筆に値する。本研究成果によって、より少量の抗原を用いて短期間にハイブリドーマを樹立することが可能となり、本技術はポストゲノム研究および抗体医療分野の飛躍的な進展に貢献することが期待される。

平成 24 年 9 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。